

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/24861 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 1/20,
B01L 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09159

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. August 2001 (08.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 46 175.1 19. September 2000 (19.09.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **BADER, Augustinus** [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, 31275 Lehrte-Immensen (DE).

(74) Anwalt: **LORENZ, Werner**; Lorenz & Kollegen, Alte Ulmer Strasse 2, 89522 Heidenheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ,

DM, DZ, EC, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR GROWING AND/OR TREATING CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM ZÜCHTEN UND/ODER BEHANDELN VON ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for growing and/or treating cells in an automated manner, for diagnostic purposes. The inventive method involves a cell culture plate comprising a plurality of bore holes for receiving cells, said holes being open on the upper side of the cell culture plate and closed on the lower side of the same. Oxygen and/or nutrients are dynamically supplied to the bore holes used as cell culture chambers.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum automatisierten Züchten und/oder Behandeln von Zellen für diagnostische Zwecke mit einer Zellkulturplatte, die eine Vielzahl von auf der Oberseite der Zellkulturplatte offenen und auf der Unterseite geschlossenen Bohrungen aufweist, in den Zellen Aufgenommen werden, mit einer dynamischen Zufuhr von Sauerstoff und/oder Nährstoffen zu den als Zellkulturräume fungierenden Bohrungen.

WO 02/24861 A2

Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum automatisierten Züchten und/oder Behandeln von Zellen für diagnostische Zwecke. Die Erfindung betrifft weiterhin auch eine Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen und die Verwendung einer Zellkulturplatte zu diesem Zweck.

In der älteren DE 199 35 643.2 A1 ist eine Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen beschrieben, wobei auf einem Träger ein formbarer Zellkulturraum angeordnet ist. Der Zellkulturraum wird dabei durch den Träger oder eine Trägerfolie auf einer Seite und eine Zellkulturfolie auf der anderen Seite, die elastisch ist, gebildet. Mit einer Vorrichtung dieser Art, ist es möglich, eine Massenkultur von Zellen mit großer Variabilität und für viele Einsatzzwecke durchzuführen.

Zum weiteren Stand der Technik wird auch auf die DE 197 19 751 A1 verwiesen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum automatisierten Züchten und/oder Behandeln von Zellen zu schaffen, wobei auf möglichst geringem Raum eine hohe Anzahl von Zellen, die auch von unterschiedlicher Art sein können, für diagnostische Zwecke gezüchtet und/oder behandelt werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das in Anspruch 1 genannte Verfahren gelöst.

In den Ansprüchen 5 und 6 ist jeweils eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens beschrieben.

Die Verwendung einer an sich bekannten Zellkulturplatte zur Lösung der gestellten Aufgabe ist in Anspruch 13 aufgezeigt.

Zellkulturplatten dieser Art sind in der Medizin, insbesondere in der Arzneimittelforschung, allgemein unter der Marke Wellplatte oder Multiwellplatte bekannt. Dabei werden in Bohrungen bzw. Vertiefungen der Zellkulturplatte Zellen für analytische Tests eingebracht. Anschließend werden die Zellen durch Pipettieren mit den verschiedensten Substanzen in Berührung gebracht, und deren Auswirkungen auf die Zellen beobachtet.

Erfindungsgemäß wird jedoch nunmehr in völliger Abwandlung der bisherigen Verwendung einer derartigen Zellkulturplatte, diese zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen in einem dynamischen Verfahren verwendet. Dies bedeutet, durch die Zufuhr von Sauerstoff und/oder Nährstoffen, welche kontinuierlich oder auch diskontinuierlich erfolgt, lassen sich nunmehr Zellen über einen längeren Zeitraum züchten und/oder behandeln und beobachten. Die hierzu erforderliche Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff kann auf die verschiedenartigste Weise erfolgen.

In einfacher Weise können dabei Nährstoffe und Sauerstoff gemeinsam durch eine kontinuierliche oder auch diskontinuierliche Durchströmung der nunmehr zu Zellkulturräumen umfunktionierten Vertiefungen bzw. Bohrungen geleitet werden.

In einer sehr vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung kann jedoch eine separate Zufuhr von Sauerstoff in den Zellkul-

turraum von der Unterseite der Zellkulturplatte aus über eine gaspermeable Folie oder Membrane eingebracht werden. Normalerweise sind die Zellkulturplatten mit stabilen, gasundurchlässigen Böden versehen. Ersetzt man nun diese Böden durch eine entsprechende gaspermeable Folie bzw. Membrane und sorgt für eine entsprechende Sauerstoff- bzw. Luftzufuhr zu diesen Bereichen, so ist eine einfache und sehr intensive Sauerstoffzufuhr zu den Zellen gegeben.

Eine weitere Möglichkeit zur Zufuhr von Nährstoffen und/oder Sauerstoff kann darin bestehen, daß in wenigstens einen Teil der Bohrungen bzw. Zellkulturräume der Zellkulturplatte Einsätze einsetzbar sind, welche jeweils mit Zulaufbohrungen und Rücklaufbohrungen versehen sind.

Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen und aus den nachfolgend anhand der Zeichnung beschriebenen Ausführungsbeispielen.

Es zeigt:

Fig. 1 eine Zellkulturplatte (Multiwellplatte) in perspektivischer Ansicht;

Fig. 2 einen Schnitt nach der Linie II-II der Fig. 1 in vergrößerter Darstellung mit der Ausbildung der Bohrungen der Zellkulturplatte, jeweils als Zellkulturraum;

Fig. 3 einen Schnitt nach der Linie III-III der Fig. 2;

Fig. 4 eine alternative Ausgestaltung der Ausbildung von Zellkulturräumen in einem Schnitt ähnlich dem nach der Fig. 2;

Fig. 5 eine weitere Ausgestaltung zur Bildung von Zellkulturräumen, ebenfalls in einem Schnitt entsprechend dem nach der Fig. 2;

Fig. 6 prinzipmäßig die Zufuhr und Abfuhr von Nährstoffen zu den Zellkulturräumen in einer Draufsicht; und

Fig. 7 ausschnittsweise eine Ausgestaltung, wobei die Zellkulturräume unter Druck setzbar sind.

Zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen für diagnostische Zwecke wird eine an sich bekannte Zellkulturplatte 1 (Multiwellplatte) verwendet, die im allgemeinen entsprechend ihrer Größe, eine hohe Anzahl von Löchern bzw. Bohrungen 2 aufweist. Die Bohrungen 2 haben Durchmesser von wenigen Millimetern bis zu mehreren Millimetern, und deren Anzahl kann bis zu mehreren Hundert Stück pro Zellkulturplatte 1 betragen.

Aus den Figuren 2 bis 5 sind verschiedene Ausgestaltungen der Bohrungen 2 bzw. deren Umfunktionierung zu Zellkulturräumen 2' ersichtlich. Gemäß Fig. 2 wird in jede Bohrung 2, die als Zellkulturraum 2' dienen soll, ein Einsatz 3 eingesetzt, der mit einer Zulaufbohrung 4 und einer Rücklaufbohrung 5 versehen ist, welche sich von der Oberseite der Zellkulturplatte 1 bis zu deren Unterseite erstrecken, wobei die Unterseiten der Zellkulturplatte bzw. die Bohrungen 2 mit Böden 6 abgeschlossen sind. Die Einsätze 3 werden somit von der Oberseite der Zellkulturplatte 1 aus in die offenen Bohrungen 2 eingesetzt. Zur Abdichtung der Zellkulturräume 2'

sind die Einsätze 3 jeweils umfangseitig mit einem Dichtring 19 versehen.

Von der jeweils zu dem Boden 6 gerichteten Seite eines Einsatzes 3 aus, ragt ein Trennsteg 7 in Richtung auf den Boden 6. Der Trennsteg 7 liegt zwischen der Zulaufbohrung 4 und der Rücklaufbohrung 5 und erstreckt sich, wie aus der Fig. 3 ersichtlich ist, quer über die Bohrung 2. Durch den Trennsteg 7 wird erreicht, daß die über die Zulaufbohrung 4 eingebrachten Nährstoffe nicht in einem "Kurzschluß" direkt zu der Rücklaufbohrung 3 strömen können. Durch den Trennsteg 7 werden sie gezwungen, entsprechend den gesamten Zellkulturraum 2' zu durchströmen und dabei die auf den Boden 6 eingebrachten Zellen 8 zu überströmen. Gleichzeitig kann der Trennsteg 7 auch zur Zentrierung bzw. zum leichteren Einführen des Einsatzes 3 in die Bohrung 2 dienen.

Bei der in der Fig. 2 links dargestellten Ausgestaltung mit dem Einsatz 3 erfolgt die Sauerstoffzufuhr zu den Zellen 8 zusammen mit der Zufuhr von Nährstoffen über die Zulaufbohrung 4. Entfernt man den festen Boden 6 und ersetzt diesen durch eine gaspermeable Folie oder Membrane 9 entsprechend der rechts in der Figur in der Dicke stark vergrößert dargestellten Ausgestaltung, so kann eine sehr intensive und direkte Sauerstoffzufuhr von der Unterseite der Zellkulturplatte 1 aus durch die gaspermeable Folie erfolgen (siehe Pfeile). Auf der gaspermeablen Folie 9, die in den Figuren aus Übersichtlichkeitsgründen wesentlich dicker dargestellt ist, erfolgt die Zucht und die Behandlung der Zellen 8.

Die Fig. 4 zeigt anstelle einer Vielzahl von in die Bohrungen 2 einzusetzenden Einsätze 3 eine Deckplatte 10, welche in der Fig. 1 nur ganz allgemein gestrichelt dargestellt ist. In die Deckplatte 10 sind in entsprechenden Bohrungen

der Deckplatte Zulaufanschlüsse 4' und Rücklaufanschlüsse 5' eingesetzt. Wie ersichtlich, ragen die Zulaufanschlüsse 4' im Vergleich zu den Rücklaufanschlüssen 5' deutlich tiefer in die dazugehörigen Bohrungen 2 bzw. die Zellkulturräume 2'. Wie weiter ersichtlich, wird durch diese Maßnahme ebenfalls erreicht, daß keine Kurzschlußströmung direkt von einem Zulauf zu einem Rücklauf erfolgt. Die Zellen 8 werden vielmehr von dem Nährmedium überströmt. In der Fig. 4 sind ebenfalls die beiden Varianten mit einem festen Boden 6 und einer gaspermeablen Folie bzw. Membrane 9 nebeneinander dargestellt.

Links in der Fig. 4 ist dargestellt, wie die Deckplatte 10 durch Schrauben 11 mit der Zellkulturplatte 1 verbunden ist. Rechts ist dargestellt, daß anstelle oder zusätzlich zu einer Verbindung über Schrauben 11 auch eine Abdichtung durch eine Dichtungseinrichtung 12 zwischen der Deckplatte 10 und der Zellkulturplatte 1 erreicht werden kann.

In der Fig. 5 ist prinzipmäßig eine zweiteilige Ausbildung der Deckplatte 10 mit einer oberen Abdeckung 10a und einer unteren Abdeckung 10b dargestellt. Wie ersichtlich, sind die obere Abdeckung 10a und die untere Abdeckung 10b abstandseinstellbar miteinander verbunden. Durch dazwischen gelegte Federn 13 wird eine Vorspannung erreicht. Die obere Abdeckung 10a wird über Stege 14 an den Rändern der Zellkulturplatte 1 umlaufend auf diese aufgesetzt. Die untere Abdeckung 10b ist mit Bohrungen versehen, durch die Zulaufanschlüsse 4' und Rücklaufanschlüsse 5', ähnlich der Ausgestaltung nach der Fig. 4, geschoben sind. Die Zulaufanschlüsse 4' und Rücklaufanschlüsse 5' sind entsprechend auch durch die obere Abdeckung 10a entweder auf deren Oberseite oder gegebenenfalls auch seitlich an den Rändern herauszuführen. Durch die Federn 13 wird eine Abdichtung der Zell-

kulturräume erreicht, weil die untere Abdeckung 10b entsprechend dicht auf der Oberseite der Zellkulturplatte 1 aufliegt. Gleichzeitig werden auf diese Weise auch Ansätze 15, die auf der Unterseite der unteren Abdeckung 10b nach unten aus dieser vorstehen in die Bohrungen 2 zur Bildung von abgeschlossenen Zellkulturräumen 2' eingeführt.

Aus der Fig. 5 ist in gestrichelter Darstellung auch ersichtlich, daß man die gesamte Einheit mit der Zellkulturplatte 1 in eine Wanne 16 setzen kann. Die Zellkulturplatte 1 sitzt dabei umlaufend dicht auf der Wanne 16 auf. Zwischen den in diesem Falle aus einer gaspermeablen Folie bzw. Membrane 9 gebildeten Boden und dem Wannenboden befindet sich ein Zwischenraum 17. Führt man Sauerstoff in die Wanne 16 ein, z.B. über Bohrungen 18, so erfolgt eine sehr intensive direkte Sauerstoffversorgung für die in den Zellkulturräumen 2' liegenden Zellen 8 durch die Folie bzw. Membrane 9.

Die Bohrungen 18 können vorzugsweise der Größe der Bohrungen 2 entsprechen. Der Zwischenraum 17 kann gegebenenfalls entfallen, wobei in diesem Fall die Zellkulturplatte 1 direkt auf dem Boden der Wanne 16 aufsitzt und über eine, vorzugsweise dem Durchmesser der Zellkulturräume 2' entsprechende Öffnung, mittels einer gaspermeablen Folie 9 bzw. Membran 9 ein Gasaustausch erfolgen kann. Die Bohrungen 18 in der Wanne 16 ermöglichen noch eine Sichtverbesserung bei mikroskopischer Beobachtung der Zellen. Vorzugsweise ist hierfür auch das Material der Deckplatte 10 wie auch der Wanne 16 aus transparentem Material hergestellt, wie z.B. Polycarbonat oder Polysteren.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und der Vorrichtung wird aus einer an sich bekannten Zellkulturplatte 1 eine Art Bioreaktor zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen. Durch die

dynamische Zufuhr von Nährmedium und Sauerstoff ist dabei auch eine Langzeitkultur möglich.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist die Automatisierungsmöglichkeit von routinemäßig ablaufenden Prozessen, wie z.B. von in beliebigen nach oben offenen Kulturgefäßen.

An sich bekannte Zellkulturplatten herkömmlicher Bauart können auf einfache Weise auch für das erfindungsgemäße Verfahren abgewandelt werden. So kann z.B. auf einfache Weise der feste Boden 8 entfernt werden und eine gaspermeable Folie 9 über die nun auf beiden Seiten offenen Bohrungen 2 auf der Unterseite der Zellkulturplatte 1 gespannt werden. Über die gaspermeable Folie 9 kann man die Entwicklung der Zellen 8 auch im Bedarfsfall beobachten, wozu die Folie 9 entsprechend durchsichtig auszubilden ist.

Dadurch, daß die Zellen 8 sehr definiert als Schicht mit zweidimensionaler Ausdehnung in den Zellkulturräumen 2' wachsen bzw. angeordnet sind, läßt sich die gesamte Zellkulturplatte 1 im Bedarfsfalle auch einfrieren, wenn man die Zellen transportieren oder bis zu deren Verwendung zwischenslagern möchte.

In der Regel wird man für das Kulturverfahren alle oder einen Großteil der Bohrungen 2 einer Zellkulturplatte zu Zellkulturräumen 2' umfunktionieren. Im Bedarfsfalle ist es selbstverständlich auch möglich, auch nur einzelne Zellkulturräume 2' mit entsprechend einzelnen Einsätzen 3 zu schaffen, da die Einsätze 3 auch alleine einsetzbar sind. Die Einsätze 3 können auch bei einzelnen Kultureinheiten individuell angeströmt bzw. entleert werden.

Wesentlich ist in jedem Falle, daß für eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu den Zellen 8 gesorgt wird, um auch ein länger dauerndes Zellkulturverfahren, insbesondere für "anspruchsvolle" Zellen, durchführen zu können. Aufgrund der Ausgestaltung der bekannten Zellkulturplatten 1, insbesondere der Bohrungen 2, war eine Züchtung und/oder Behandlung von Zellen in der erfindungsgemäßen Form bisher nicht möglich.

In der Fig. 6 ist prinzipmäßig die Zufuhr und die Abfuhr von Nährstoffen und gegebenenfalls von Sauerstoff zu den Zellkulturräumen 2 in einer Draufsicht dargestellt. Wie ersichtlich, ist dabei ein gemeinsamer Zulaufanschluß 20 vorgesehen, von welchem aus über mehrere Zweigleitungen 21 die einzelnen Zellkulturräume 2 mit Nährmedium und gegebenenfalls auch mit Sauerstoff versorgt werden. Anschließend folgt wiederum über einzelne Zweigleitungen 22 eine gemeinsame Abfuhr über einen Ablaufanschluß 23.

Durch den gemeinsamen Zulaufanschluß 20 und den gemeinsamen Ablaufanschluß 23 läßt sich die Vorrichtung z.B. in Form einer "docking station" verwenden, die man an eine Zentralstation anschließt, eventuell gemeinsam mit anderen Vorrichtungen. Auf diese Weise lassen sich sehr große Brutstöcke bzw. Zuchtvorrichtungen schaffen.

Die gemeinsame Zufuhr und die gemeinsame Abfuhr mit den Zweigleitungen 21 und 22 kann z.B. durch entsprechende Leitungen, Aussparungen oder Kanäle in der Deckplatte 10 erfolgen, von wo aus dann über einzelne Zweigleitungen 21 jeweils einzeln die Zellkulturräume 2 versorgt werden. In Verbindung mit der Wanne 16 läßt sich auf diese Weise eine Art Kassettenstruktur schaffen. Im Bedarfsfalle können auch mehrere Einheiten übereinander angeordnet werden. Dies ist z.B. da-

durch möglich, daß man mehrere Zellkulturplatten 1 übereinander anordnet, wobei die Versorgung mit Nährmedium und mit Sauerstoff durch dazwischenliegende Deckplatten 10 erfolgen kann, welche entsprechend, z.B. jeweils auf ihrer Oberseite und auf ihrer Unterseite, mit gemeinsamen Zulaufanschlüssen 20, Zweigleitungen 21 und 22 und gemeinsamen Ablaufanschlüssen 23 versehen sind.

Je nach Größe der Zellkulturräume 2 und deren Anzahl kann es gegebenenfalls erforderlich sein, daß mehrere Deckplatten 10 mit darin angeordneten Zulaufanschlüssen 20, Zweigleitungen 21 und 22 und Ablaufanschlüssen 23 vorgesehen sind, die aus Platzgründen mit entsprechend versetzt angeordneten Zweigleitungen 21 und 22 versehen sind, damit alle Zellkulturräume 2 versorgt werden können.

Zusätzlich und alternativ kann man auch die Zellkulturplatten 1 selbst mit gemeinsamen Zulaufanschlüssen 20, Zweigleitungen 21 und 22 und mit gemeinsamen Ablaufanschlüssen 23 jeweils versehen, um jeden Zellkulturraum 2 erreichen zu können. Hierzu kann man z.B. eine Zellkulturplatte 1 in der Mitte aufteilen und im Bereich der Trennebene die Strömungskanäle einbringen. In jedem Fall sollte jedoch eine Kanalführung geschaffen werden, durch die eine gleichmäßige Versorgung aller Zellkulturräume 2 gewährleistet wird.

Die Folie bzw. die Membrane 9 kann im Bedarfsfalle auch mikroporös ausgestaltet sein, was den Vorteil hat, daß man nicht nur von oben, sondern zusätzlich oder alternativ auch von unten her Nährmedium in die Zellkulturräume 2' einbringen kann.

In der Fig. 7 ist eine sehr vorteilhafte Ausgestaltung dargestellt, wobei die Zellkulturräume 2' unter Druck gesetzt

werden können. Hierzu ist die Zellkulturplatte 1 auf der Oberseite durch einen druckdichten Dom 24 und auf der Unterseite durch einen druckdichten Behälter 25 abgeschlossen. Die Öffnungen 2 auf der Oberseite der Zellkulturplatte 1 sind mit einer flexiblen Folie 26 abgeschlossen, welche im Bedarfsfalle auch gaspermeabel oder mikroporös sein kann, um von dieser Seite aus eine Versorgung der in den Zellkulturräumen 2' sich befindenden Zellen 8 mit Sauerstoff/Luft und/oder Nährmedium zu erreichen. Auf der Unterseite sind die Zellkulturräume 2' ebenfalls durch die Membrane 9, welche gaspermeabel oder mikroporös ausgebildet ist, abgeschlossen.

Durch nicht näher dargestellte Druckanschlüsse 27 kann über entsprechende Druckquellen ein Raum 28 zwischen dem Dom 24 und der Folie 26 und ein Raum 29 zwischen der Membrane 9 und dem Boden des Behälters 25 unter Über- oder Unterdruck gesetzt werden. Die Steuerung der Druckverhältnisse ist dabei beliebig. Dies bedeutet, es kann abwechselnd Druck von oben oder von unten oder auch gleichzeitig auf die Zellkulturräume 2' ausgeübt werden. Hierzu verformen sich die Folie 26 und die Membrane 9 entsprechend (siehe gestrichelte Darstellung). Auf diese Weise werden die Zellen 8 entsprechend mechanisch bewegt, was z.B. erhebliche Vorteile für die Erstellung von Geweben, wie z.B. Knochen, Knorpel, Muskulatur und dergleichen, besitzt, da durch Dehnungen im Sinne von Konditionierungen bzw. einem Training simuliert werden können. Zusätzlich können in den Zellkulturräumen 2' rhythmische oder intermittierende Druckbelastungen erzeugt werden. Durch diese Maßnahmen lassen sich in vivo-Verhältnisse besser simulieren.

Durch die Verwendung der Folie 26 sind die Zellkulturräume 2' im Bedarfsfalle auch Pipettierungsprozessen zugänglich.

Anstelle einer einfachen Folie 26 können die Öffnungen 2 auch durch eine septumartiges Kunststoffmembran abgedeckt werden.

Anstelle von Druckbelastungen oder auch zusätzlich können elektrische Ströme den Zellen 8 auferlegt werden. Auf diese Weise können z.B. auch Dehnungen über elektromagnetische Felder ausgelöst werden, was z.B. für Herzmuskelzellen, ZNS-Zellen (neuronale Zellen) von Vorteil ist. Auf diese Weise kann man z.B. Medikamente testen, die die Herzfrequenz beschleunigen oder reduzieren, wozu die elektrischen Ströme praktisch Herzmuskelzellen elektrisch stimulieren. Auf diese Weise kommt es zu Interaktionen zwischen einem technischen und einem biologischen System.

Die vorstehend beschriebene Zellkultursysteme können im Bedarfsfalle auch in Form eines Bioreaktors bzw. im Sandwich-System miteinander kombiniert werden. Hierzu ist es lediglich erforderlich, anstelle einer Wanne 16 oder dem Behälter 25 einen entsprechend gestalteten Zwischenboden vorzusehen, so daß sich - wie in der Fig. 7 gestrichelt angedeutet - eine weitere Einheit 30 unter dem Behälter 25 bzw. unter einem entsprechenden Zwischenboden anschließt. Dabei können mehrere derartige Einheiten übereinander angeordnet werden. Der dabei entstehende Bioreaktor kann in diesem Falle stufenförmig aufgebaut sein oder auch spiegelbildlich, wobei sich an die in der Fig. 7 beschriebene Einheit spiegelbildlich eine weitere Einheit anschließt. In diesem Falle dient der Raum 29 zur Zufuhr von Luft/Sauerstoff und/oder Nährmedium sowohl für die Zellkulturplatte 1 als auch für die in der Einheit 30 sich befindende Zellkulturplatte (nicht dargestellt). Selbstverständlich sind im Bedarfsfalle jedoch auch getrennte Zu- und Abflüsse möglich.

Anstelle von einfachen Zellen 8 in den Zellkulturräumen 2' können selbstverständlich auch mehrschichtige Kulturen gezüchtet werden.

Als eines der wesentlichen Unterschiede zum Stand der Technik ist festzuhalten, daß es sich bei dem vorliegenden Zellkultursystem um dynamische Prozesse handelt, welche kontinuierlich oder intermittierend ablaufen können und nicht nur um eine statische Züchtung von Zellkultursystemen, welche nach Anlegen nicht mehr weiterbehandelt werden.

Grundsätzlich liegen bei dem vorliegenden System drei Verfahren mit dazugehörigen Vorrichtungen vor, nämlich:

1. Im einfachsten Fall sind geschlossene Böden vorhanden und die Versorgung der Zellkulturräume 2' erfolgt von oben über die Öffnungen bzw. Bohrungen 2 mit entsprechenden Zulaufbohrungen 4 und Rücklaufbohrungen 5.
2. Eine Ausgestaltung der Zellkulturplatten 1 mit einer gaspermeablen oder mikroporösen Membrane 9 auf der Unterseite und abgeschlossenen Bohrungen 2 auf der Oberseite, mit oder ohne Zulaufbohrungen 4 und Rücklaufbohrungen 5.
3. Elastische Folien sowohl auf der Oberseite als auch auf der Unterseite der Zellkulturplatte 1, die gaspermeabel oder mikroporös sein können und welche mit entsprechenden Drücken belastet werden. Die gaspermeable oder mikroporöse Membrane 9 auf der Unterseite kann aus einer Vielzahl von einzelnen Membranen gebildet sein, die die Zellkulturräume 2' auf der Unterseite jeweils abdecken. Im allgemeinen wird man jedoch eine Folie verwenden, die die gesamte Unterseite der Zellkulturplatte 1 entsprechend abdeckt, wie dies in der Fig. 7 dargestellt ist.

Erfindungsgemäß können nunmehr komplexe Zellkultursysteme, die entsprechend höhere Anforderungen an die Mikroumgebung stellen, behandelt werden. Dabei kann man in den Bohrungen 2 der Zellkulturplatte 1 auch eine 3-D Struktur mit zweidimensionaler Ausdehnung definieren, die in vivo dem Abstand von einer Kapillare zur nächsten Kapillare entspricht. Dieser bioartifizielle Gewebeschnitt dient der Erstellung organotypischer Kulturbedingungen auf kleinstem Raum und ermöglicht es somit auch komplexere Kultursysteme unter Verwendung von verschiedenen Zelltypen und extrazellulärer Matrix dem High-Throughput-Screening zugänglich zu machen.

Grundsätzlich liegt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Dünnschichtkultursystem vor, das in vorteilhafter Weise von unten oxigeniert wird und das der physiologischen Zelldichte entspricht, und zwar in dem Abstand einer Blutkapillare im Organismus bis zur nächsten Blutkapillare.

Eines der Hauptvorteile der vorliegenden Erfindung liegt in der Miniaturisierung mit möglichst kleinen Einheiten auf engem Raum. Auf diese Weise werden auch wenig Zellen für ein Kulturverfahren benötigt, die sich dann während des Verfahrens entsprechend vermehren können.

Eines der Haupteinsatzgebiete des erfindungsgemäßen Verfahrens und der Vorrichtung hierzu ist deshalb die Untersuchung bzw. die Auswirkung von Chemikalien und Pharmazeutikas auf Zellen, insbesondere auf menschliche Zellen. Auf diese Weise können Tierversuche, die sehr aufwendig und teuer durchzuführen sind, zumindest teilweise ersetzt werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum automatisierten Züchten und/oder Behandeln von Zellen für diagnostische Zwecke mit einer Zellkulturplatte (1), die eine Vielzahl von auf der Oberseite der Zellkulturplatte (1) offenen und auf der Unterseite geschlossenen Bohrungen (2) aufweist, in denen Zellen aufgenommen werden, mit einer dynamischen Zufuhr von Sauerstoff und/oder Nährstoffen zu den als Zellkulturräume (2') fungierenden Bohrungen (2).
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Nährstoffe mit oder ohne Sauerstoff die Bohrungen (2) durchströmen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Sauerstoff durch eine gaspermeable Ausbildung der Böden (6) in die Bohrungen (2) eingebracht wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Böden (6) oder eine anstelle der Böden (6) vorgesehene Membrane (9) mikroporös sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellkulturräume (2') mit unterschiedlichen Drücken beaufschlagt werden.
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a ß
wenigstens ein Teil der Bohrungen (2) der Zellkultur-
platte (1) auf ihren von den Öffnungen abgewandten Sei-
ten mit gaspermeablen oder mikroporösen Folien oder Mem-
branen (9) als Böden abgeschlossen sind.

7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem
der Ansprüche 1 bis 5,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a ß
in wenigstens einen Teil der Bohrungen (2) der Zellkul-
turplatte (1) Einsätze (3) einsetzbar sind, welche je-
weils mit Zulaufbohrungen (4) und Rücklaufbohrungen (5)
versehen sind.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a ß
die Einsätze (3) jeweils auf ihrem zu den Böden (6) ge-
richteten Seiten mit einem Trennsteg (7) zwischen den
Zulaufbohrungen (4) und den Rücklaufbohrungen (5) verse-
hen sind.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a ß
von den Zulaufbohrungen (4) und Rücklaufbohrungen (5)
aus jeweils Zulaufanschlüsse (4') und Rücklaufanschlüsse
(5') sich in Richtung zu den Böden (6) erstrecken, wobei
die Zulaufanschlüsse (4') und die Rücklaufanschlüsse
(5') jeweils unterschiedlich weit in die Bohrungen (2)
ragen.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a ß
die Einsätze (3) umfangseitig jeweils mit einem Dich-
tring (19) versehen sind.

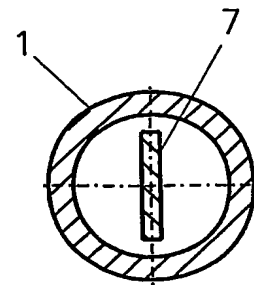
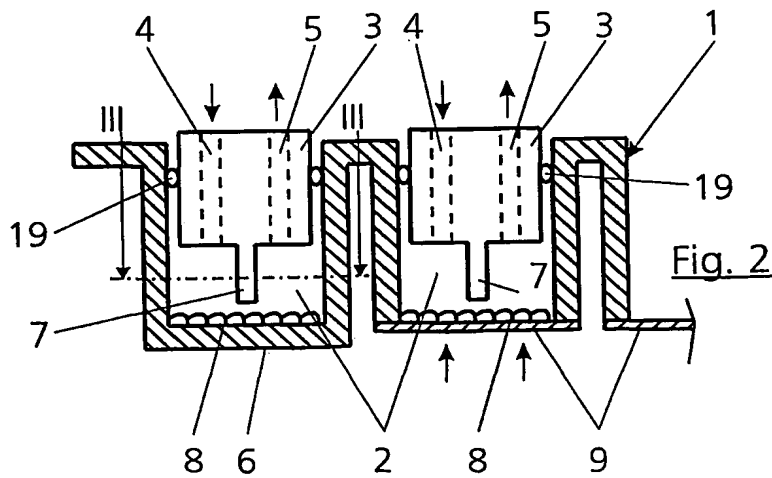
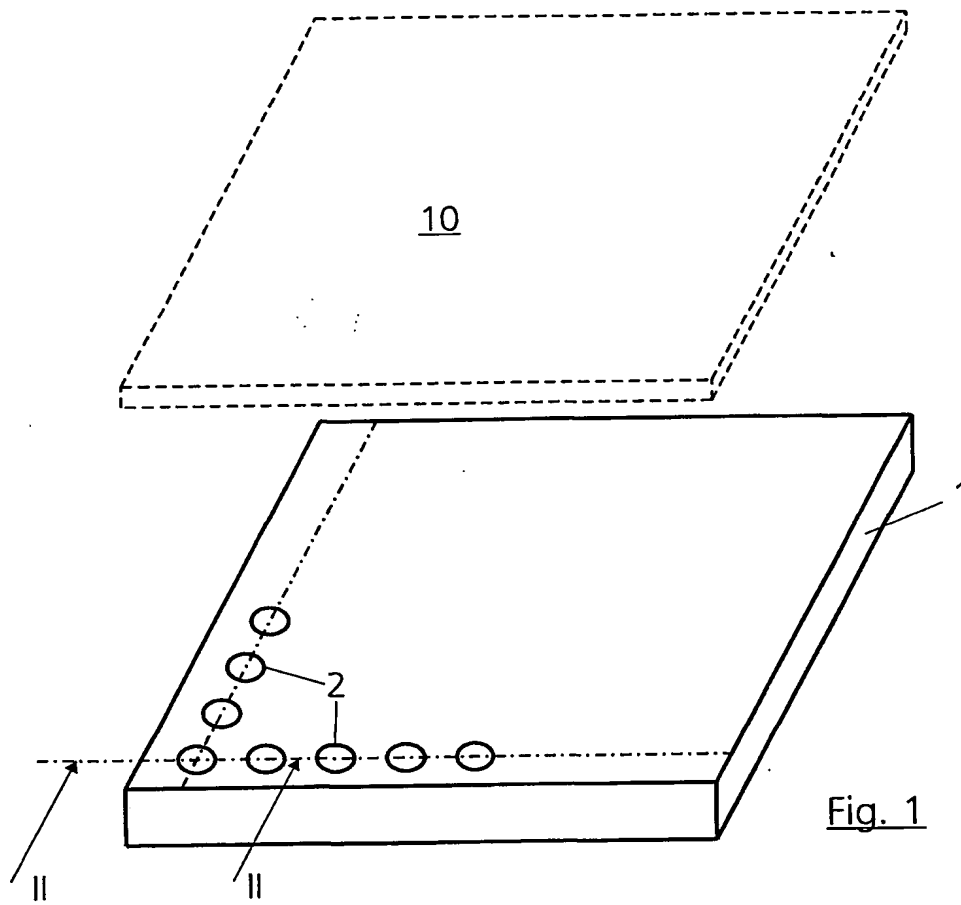
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellkulturplatte (1) mit einer Deckplatte (10) abgedeckt ist.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Deckplatte (10) durch Schrauben (11) mit der Zellkulturplatte (1) verbunden und/oder die Zellkulturplatte (1) durch eine Dichtungseinrichtung (12) abgedichtet ist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Deckplatte (10) zweiteilig ausgebildet ist, mit einer oberen Abdeckung (10a) und einer unteren Abdeckung (10b), wobei die beiden Abdeckungen (10a,10b) elastisch oder zueinander beweglich miteinander verbunden sind.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, daß
die untere Abdeckung (10b) mit Ansätzen (15) versehen ist, die in wenigstens einen Teil der Bohrungen (2) ragen, und die mit Zulaufanschlüssen (4') und Rücklaufanschlüssen (5') versehen sind.
15. Vorrichtung nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Deckplatte (10) mit wenigstens einem Zulaufanschluß (20), mit Zweigkanälen (21,22) und mit wenigstens einem Ablaufanschluß (23) zur Versorgung der Zellkulturräume (2) mit Nährmedium und/oder Sauerstoff versehen sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, daß
mehrere Deckplatten (10) zur Versorgung von ein oder mehreren Zellkulturplatten (1) vorgesehen sind.
17. Vorrichtung nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellkulturplatte (1) zweiteilig ausgebildet ist, wobei in der Trennebene wenigstens ein Zulaufanschluß (20), Zweigkanäle (21,22) und wenigstens ein Ablaufanschluß (23) vorgesehen sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellkulturplatte (1) in eine Wanne (16) eingesetzt ist.
19. Vorrichtung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Wanne (16) mit Sauerstoffzuleitungen und Sauerstofföffnungen (18) in ihrer Wandung versehen ist.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 19,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellkulturräume (2') über Druckanschlüsse (27) unter wechselnden Druck setzbar sind.
21. Vorrichtung nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet, daß
zusätzlich zu der elastischen Membrane (9) auf der Unterseite der Zellkulturplatte (1) die Bohrungen (2) auf der Oberseite der Zellkulturplatte (1) mit einer elastischen Folie (26) abgedeckt ist, und daß Zwischenräume

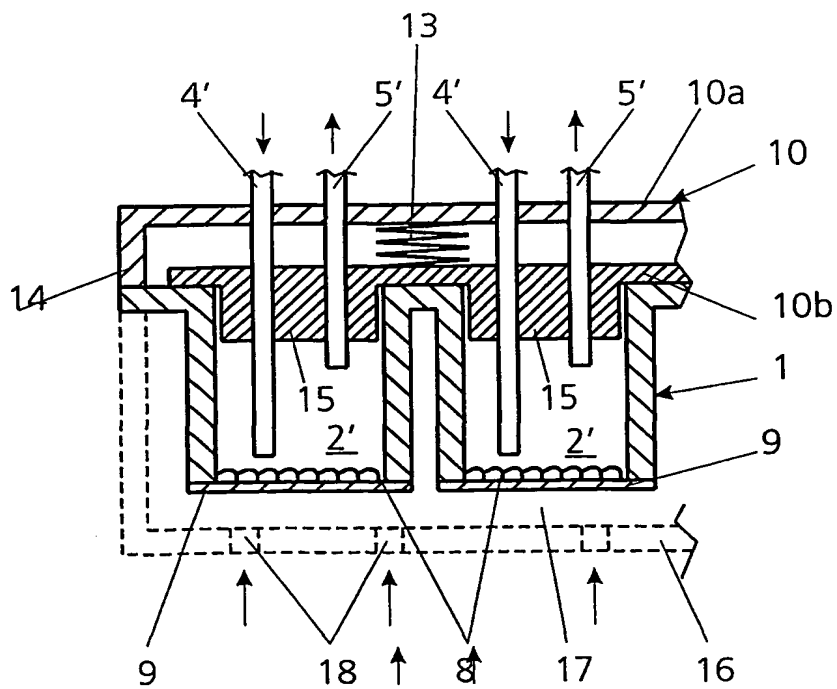
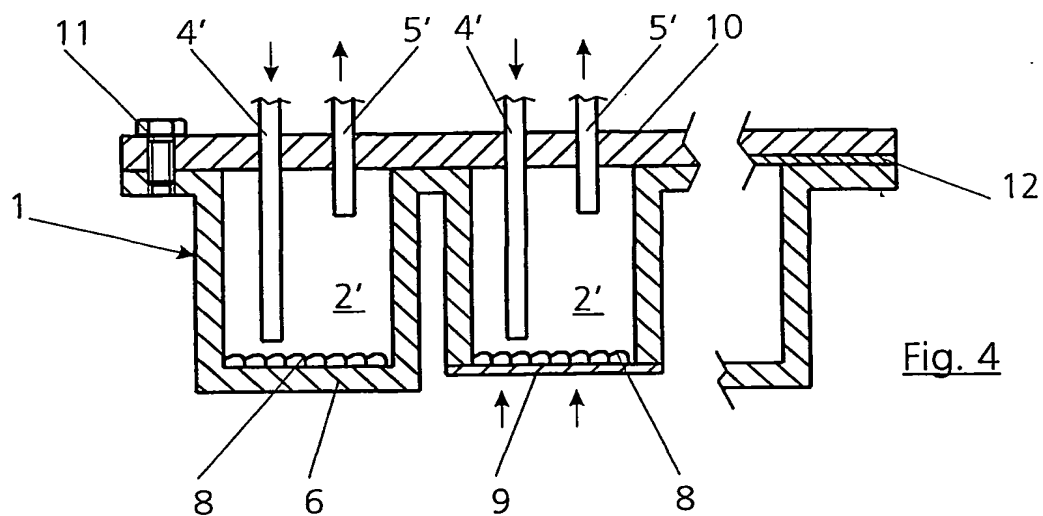
(28,29) über und unterhalb der Zellkulturplatte (1) unter Druck setzbar sind.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatte (10) und/oder die Wanne (26) bzw. der Behälter (25) als Zwischenbehälter ausgebildet sind, und daß über die Zwischenbehälter ein oder mehrere Einheiten (30) zur Bildung eines Bioreaktors mit gemeinsamen oder mit separaten Anschlüssen ansetzbar sind.
23. Verwendung einer Zellkulturplatte (1) nach einem der Ansprüche 6 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellkulturplatte (1) in eine Wanne (16) eingebracht ist und mit einer Deckplatte (10) und einem Wannenboden zur automatisierten Perfusion versehen ist.
24. Verwendung einer Zellkulturplatte (1), die eine Vielzahl von auf der Oberseite der Zellkulturplatte (1) offenen Bohrungen (2) aufweist, die auf der Unterseite durch Böden (6) abgeschlossen sind, zum automatisierten Züchten und/oder Behandeln von Zellen (8) für diagnostische Zwecke, die in die Bohrungen (2) eingebracht werden.
25. Verwendung einer Zellkulturplatte nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Teil der Böden (6) der Zellkulturplatte (1) gaspermeabel oder mikroporös ausgebildet ist.

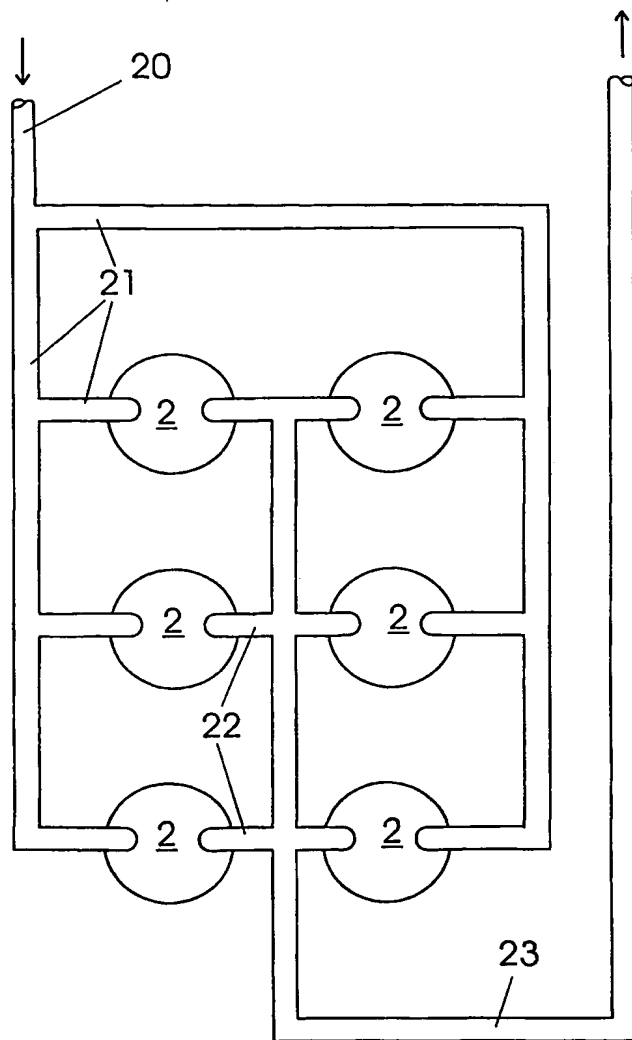
1/4



2/4



3/4

Fig. 6

4/4

